

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 30 550.1

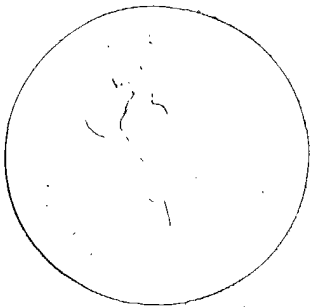
**Anmeldetag:** 5. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** Dade Behring Marburg GmbH, Marburg/DE

**Bezeichnung:** Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT)– spezifische Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung

**IPC:** C 07 K und C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.



München, den 28. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Fausl

## **Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) –spezifische Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper, die in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes (CDT) binden, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht. CDT ist dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen.

Alkoholismus ist ein weltweit verbreitetes Problem. Es wurden in der Vergangenheit eine Reihe von diagnostischen Testen entwickelt, um Alkoholismus zu diagnostizieren. Die meisten dieser Teste sind jedoch nicht spezifisch für die Erkrankung. Der bisher am weitesten entwickelte Test wurde von Makhlof et al. in der EP-0 605 627 vorgestellt. Die darin offenbarten Antikörper reagieren spezifisch mit dem Transferrin-Homologen „Carbohydrate Deficient Transferrin“ (CDT), das bei Alkoholikern, nicht jedoch bei Nicht-Alkoholikern gefunden wurde. Damit wurde es möglich, einen Immuntest aufzubauen, mit dessen Hilfe CDT in Alkoholiker-Seren nachgewiesen werden kann. Nachteilig ist bei diesem Test jedoch, daß das nachzuweisende Antigen zunächst an eine Festphase gekoppelt werden muß, da die in der EP-0 605 627 offenbarten Antikörper nicht oder nur ungenügend an CDT binden, welches sich in Lösung befindet.

Es bestand somit die Aufgabe, den CDT-Nachweis in der Weise zu verbessern, daß der Direktnachweis von in Lösung befindlichem CDT in einer Probe möglich wird und somit die Notwendigkeit der Koppelung des nachzuweisenden Antigens an eine feste Phase entfällt.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise durch Bereitstellung von Antikörpern gelöst, die in wäßriger Lösung selektiv an CDT binden, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht. Mit Hilfe von Epitop-Kartierungsexperimenten wurde festgestellt, daß erfindungsgemäße Antikörper, im Gegensatz zu Antikörpern

aus dem Stand der Technik, an unterschiedliche Sequenzabschnitte des CDT gleichzeitig binden. Daraus wurde abgeleitet, daß es sich bei den von erfindungsgemäßen Antikörpern erkannten Epitopen um diskontinuierliche Epitope handelt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit einen Antikörper, der in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht, wobei dem Transferrin-Homologen mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen. Es wurde festgestellt, daß dieser Antikörper an die gemäß EP-0 605 627 hergestellten Peptide P1 oder P2 nicht oder im wesentlichen nicht bindet, wobei es unerheblich ist, ob die Peptide festphasengebunden oder in Lösung vorliegen.

Selektive Bindung bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine ausreichend spezifische oder im wesentlichen spezifische Bindung, die eine deutliche Unterscheidung zwischen einem wie vorstehend definierten Transferrin-Homologen einerseits und Humantransferrin andererseits ermöglicht.

Der Begriff „Festphase“ oder „feste Phase“ im Sinne der vorliegenden Erfindung beinhaltet einen Gegenstand, der aus porösem und/oder nicht porösem, in der Regel wasserunlöslichem Material besteht und die unterschiedlichsten Formen aufweisen kann, wie z.B. Gefäß, Röhrchen, Mikrotitrationsplatte, Kugel, Mikropartikel, Stäbchen, Streifen, Filter- oder Chromatographiepapier, etc. In der Regel ist die Oberfläche der Festphase hydrophil oder kann hydrophil gemacht werden. Die Festphase kann aus den unterschiedlichsten Materialien bestehen wie z.B. aus anorganischen und/oder aus organischen Materialien, aus synthetischen, aus natürlich vorkommenden und/oder aus modifizierten natürlich vorkommenden Materialien. Beispiele für Festphasenmaterialien sind Polymere wie z.B. Zellulose, Nitrozellulose, Zelluloseacetat, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, vernetzte Dextranmoleküle, Agarose, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polymethacrylat oder Nylon; Keramik; Glass; Metalle, insbesondere Edelmetalle wie Gold und Silber; Magnetit; Mischungen oder Kombinationen derselben; etc. Auch Zellen, Liposomen oder Phospholipidvesikel, sind vom Begriff Festphase miteerfaßt.

Die Festphase kann einen Überzug aus einer oder mehreren Schichten aufweisen, z.B. aus Proteinen, Kohlehydraten, lipophilen Substanzen, Biopolymeren, organischen Polymeren oder Mischungen hiervon, um beispielsweise die unspezifische Bindung von Probenbestandteilen an die Festphase zu unterdrücken oder zu verhindern, oder um beispielsweise Verbesserungen zu erreichen hinsichtlich der Suspensionsstabilität von partikulären Festphasen, der Lagerstabilität, der formgebenden Stabilität oder der Resistenz gegen UV-Licht, Mikroben oder sonstige zerstörend wirkender Agenzien.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen Antikörper, der selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, wobei die Bindung im Bereich der folgenden Sequenzabschnitte (1) bis (4) des Transferrin-Homologen erfolgt:

- |     |                        |     |
|-----|------------------------|-----|
| (1) | VVARSMGGKEDLIWELL      | und |
| (2) | TTEDSIKIMNGEADAMSLDGGF | und |
| (3) | SKLSMGSGNLNLSEPN       | und |
| (4) | YEKYLGEELYVKAV.        |     |

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen solchen Antikörper, dessen Bindung lediglich im Bereich von nur drei oder von nur zwei der vorstehend genannten Sequenzabschnitte (1) bis (4) erfolgt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoklonale Antikörper.

Ganz besonders bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper, die von Zellkulturen produziert werden, welche bei der DSZM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland am 16. April 2002 (Tag des Eingangs bei der Hinterlegungsstelle) nach Budapester Vertrag wie folgt hinterlegt wurden:

Zellkultur 01-102/01

Eingangsnummer: DSM ACC2541

Zellkultur 98-84/011

Eingangsnummer: DSM ACC2540

Erfindungsgemäß sind auch antigenbindende Fragmente, beispielsweise Fab-, Fab'-Fv- oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente, die aus den vorstehend genannten erfindungsgemäßen Antikörpern nach den jedem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden können.

Generell sind unter dem Begriff „Antikörper“ im Sinne dieser Erfindung nicht nur komplette Antikörper zu verstehen sondern ausdrücklich auch Antikörperfragmente, wie die bereits genannten Fab-, Fv-, F(ab')<sub>2</sub> oder Fab'-Fragmente sowie auch chimäre, humanisierte, bi- oder oligospezifische, oder „single chain“ Antikörper; des weiteren auch Aggregate, Polymere und Konjugate von Immunglobulinen und/oder deren Fragmenten, sofern die Bindungseigenschaften an das Antigen oder Hapten erhalten sind. Antikörperfragmente lassen sich beispielsweise durch enzymatische Spaltung von Antikörpern mit Enzymen wie Pepsin oder Papain herstellen. Antikörperaggregate, -polymere und -konjugate können durch vielfältige Methoden generiert werden, z.B. durch Hitzebehandlung, Umsetzung mit Substanzen wie Glutaraldehyd, Reaktion mit immunglobulinbindenden Molekülen, Biotinylierung von Antikörpern und anschließende Reaktion mit Streptavidin oder Avidin, etc..

Bei einem Antikörper im Sinne dieser Erfindung kann es sich um einen monoklonalen oder um einen polyklonalen Antikörper handeln. Der Antikörper kann nach den üblichen Verfahren hergestellt worden sein, z.B. durch Immunisierung des Menschen oder eines Tieres, wie z.B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Pferd, Schaf, Ziege, Huhn (s.a. Messerschmid (1996) BIOforum, 11:500-502), und anschließender Gewinnung des Antiserums; oder durch die Etablierung von Hybridomazellen und der anschließenden Reinigung der sekretierten Antikörper; oder durch Klonierung und Expression der Nukleotidsequenzen bzw. modifizierter Versionen davon, welche die Aminosäuresequenzen kodieren, die für die Bindung des natürlichen Antikörpers an das Antigen und/oder Hapten verantwortlich sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers durch Immunisieren eines geeigneten

Versuchstieres mit nichtglycosyliertem Transferrin, anschließendem Fusionieren der Milzzellen dieses Versuchstieres mit Myelomzellen, wobei antikörperproduzierende Hybridzellen entstehen und anschließendem Klonieren der Hybridzellen und Selektieren eines solchen Hybridzellklons, der einen Antikörper produziert, der in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht, wobei dem Transferrin-Homologen mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen; schließlich folgt die Gewinnung von Antikörpern aus dem solchermaßen selektierten Hybridzellklon nach einem dem Fachmann bekannten Verfahren.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des Antikörpers durch Immunisieren eines geeigneten Versuchstieres mit nichtglycosyliertem Transferrin, anschließendem Fusionieren der Milzzellen dieses Versuchstieres mit Myelomzellen, wobei antikörperproduzierende Hybridzellen entstehen und anschließendem Klonieren der Hybridzellen und Selektieren eines solchen Hybridzellklons, der einen Antikörper produziert, dessen Bindung nach den Ergebnissen einer Epitop-Kartierung im Bereich der folgenden Sequenzabschnitte (1) bis (4) eines Transferrin-Homologen, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, erfolgt:

- |     |                         |     |
|-----|-------------------------|-----|
| (1) | VVARSMGGKEDLIWELL       | und |
| (2) | TTEDSIAKIMNGEADAMSLDGGF | und |
| (3) | SKLSMSGSLNLSEPN         | und |
| (4) | YEKYLGEELYVKAV;         |     |

schließlich folgt die Gewinnung von Antikörpern aus dem solchermaßen selektierten Hybridzellklon nach einem dem Fachmann bekannten Verfahren.

Die vorstehend beschriebenen Herstellungsverfahren beinhalten die jedem Fachmann bekannte Hybridom-Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper, wie sie erstmals im Jahre 1975 von Köhler und Milstein veröffentlicht und seitdem von zahlreichen Autoren modifiziert oder verbessert wurde. Obwohl diese Technologie häufig zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus Mäusezellen verwendet wurden, gibt es auch Publikationen, welche die Herstellung monoklonaler

Antikörper anderer Herkunft beschreiben. Darüber hinaus sind auch Verfahren zur Herstellung von Antikörperkonstrukten bekanntgeworden, beispielsweise humanisierter oder bi- oder oligospezifischer oder chimärer Antikörper, die selbstverständlich ebenso zur Herstellung erfindungsgemäßer Antikörper herangezogen werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Immunoassay zum Nachweis eines Transferrin-Homologen, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, in einer Probe; dabei wird ein vorstehend beschriebener erfindungsgemäßer Antikörper oder ein entsprechendes Antikörperfragment mit der Probe in Kontakt gebracht und anschließend die Bildung eines Immunkomplexes unter Beteiligung des Transferrin-Homologen qualitativ oder quantitativ bestimmt.

Testkits zur Durchführung eines vorstehend genannten Immunoassays, enthaltend einen erfindungsgemäßen Antikörper oder ein erfindungsgemäßes Antikörperfragment sind ebenso Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die vorliegende Erfindung wird außerdem durch die nachfolgenden Beispiele erläutert. Diese dienen ausschließlich der exemplarischen Beleuchtung einzelner Aspekte der vorliegenden Erfindung und sind keinesfalls als Einschränkung zu verstehen.

## Beispiele

### **Beispiel 1: Herstellung von Anti-Human-Transferrin-Sepharose**

Zur Affinitätsreinigung von Transferrin aus Humansenen (Normalseren und Alkoholiker-Seren) wurde ein Affinitätsträger durch Kopplung von 120 mg Anti-human Transferrin (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland) an 0,8 g CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B hergestellt.

120 mg Anti-human Transferrin werden gegen 0,1M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung dialysiert. 0,8 g Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) werden mit 0,1M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und unter Kühlung mit 1,28 g Bromcyan gelöst in 5 ml Acetonitril versetzt. Die Suspension wird unter Rühren 15 Minuten bei pH 11 und 4°C gerührt. Anschließend wird die Suspension intensiv mit 0,1M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Die aktivierte Sepharose wird in 0,1M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung suspendiert und mit der vorbereiteten Antikörperlösung versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die so hergestellte anti-human Transferrin Sepharose wird mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 gewaschen und bis zur Verwendung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 + 1g/L  $\text{NaN}_3$  gelagert.

### **Beispiel 2: Isolierung von Humantransferrin aus Humanserum (Normalserum und Alkoholiker-Serum)**

Zur Affinitätsreinigung von Transferrin aus Humanserum wird die unter Beispiel 1 hergestellte Anti-Human-Transferrin-Sepharose in eine Glassäule gefüllt und mit 100ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 + 1g/L  $\text{NaN}_3$  gewaschen. 10ml Humanserum (Normalserum und Alkoholiker-Serum) werden mit einem Fluß von 0,5 ml/Minute auf die Säule aufgetragen und die nichtgebundenen Proteine durch Waschen der Säule mit 50 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 + 1g/L  $\text{NaN}_3$ , 50 ml 1 M NaCl-Lösung und 50 ml Wasser entfernt. Das gebundene Transferrin wird mit 50 ml 0,5 M Glycin-Lösung dessen pH-Wert mit Salzsäure auf pH 2,5 eingestellt wurde eluiert sofort durch Zugabe von festem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan neutralisiert und gegen phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 + 1g/L  $\text{NaN}_3$  dialysiert.

### Beispiel 3: Nichtglycosyliertes Humantransferrin

#### a) Rekombinantes nichtglycosyliertes Humantransferrin

Die Herstellung von rekombinanten nichtglycosyliertem Transferrin erfolgt mit Hilfe üblicher gentechnologischer und molekularbiologischer Methoden und wird in Mason et al. (1993) Biochemistry, 32: 5472-5479 beschrieben.

#### b) Enzymatische Deglycosylierung von Humantransferrin

60 mg Humantransferrin (z.B. Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) werden in 8 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 mit 10 mM/L ETDA und 1g/L (w/v) Natriumdecyl-sulfat (Fa. Fluka, Best.Nr: 71443) gelöst. Die so vorbereitete Transferrin-Lösung wird im Wasserbad auf 37°C erwärmt und 180 Einheiten (3 Einheiten / mg Transferrin) N Glycosidase F (Fa. Roche, Best.Nr: 1365193) zugegeben. Der Ansatz wird 17 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Deglycosylierung wird mittels SDS-PAGE untersucht (Duan et al (1998) Applied Biochemistry and Biotechnology, 69: 217-224).

### Beispiel 4: Herstellung von monoklonalen Antikörpern gemäß dem Stand der Technik

Die Herstellung monoklonaler Antikörpern gemäß dem Stand der Technik erfolgte wie in der Patentschrift EP-0 605 627 B1 beschrieben durch Immunisierung mit transferrinspezifischen Peptidsequenzen P1 und P2. Es wurden die folgenden Hybride / monoklonalen Antikörper erhalten:

Antikörperbezeichnung:	Spezifität:
01-32/062	anti-P1
00-177/012	anti-P1
00-187/016	anti-P2
00-187/027	anti-P2

## **Beispiel 5: Herstellung der erfindungsgemäßen, monoklonalen Antikörpern**

### **a) Immunisierung von Mäusen**

BALB/c Mäuse wurden jeweils mit 20 µg nichtglycosyliertem Transferrin in kompletten Freund'schen Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Nach 4 Wochen erfolgte ein Booster mit jeweils 20µg nichtglycosyliertem Transferrin in inkompletten Freund'schen Adjuvans ( Fa. ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Deutschland) und nach 8 Wochen mit jeweils 20 µg nichtglycosyliertem Transferrin ohne Freund'schen Adjuvans. Die letzten 3 Tage vor der Fusion wurden die Mäuse intravenös mit jeweils 20 µg nichtglycosyliertem Transferrin geboostert.

### **b) Fusion**

Nach dem Töten der Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen in serumfreien Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Fa. CC Pro GmbH, Neustadt/W, Deutschland) hergestellt. Die Zellen wurden zentrifugiert (652 g) und 2 x in DMEM gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Zu etwa 10<sup>8</sup> Milzzellen wurden 2x10<sup>7</sup> Myelomzellen (Sp2/0) gegeben. Nach dem Zentrifugieren (360 g) wurde der Überstand verworfen, 1ml Polyethylenglycol-Lösung (PEG 4000, Fa. Merck Eurolab, Bruchsal, Deutschland; ca. 50%ig in DMEM) auf das Zellpellet gegeben und nach Resuspension 1 Minute bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde tropfenweise ca. 10 ml DMEM zugegeben und 2 bis 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die fusionierten Zellen wurden abzentrifugiert (326 g) und das Pellet in DMEM + 20% FKS (fötales Kälberserum, Fa. Biowithaker Europe, Verviers, Belgien) + HAT-Lösung (Fa. CC Pro GmbH, Neustadt/W, Deutschland) resuspendiert und in 24 Well-Zellkulturplatten (Fa. Costar) abgefüllt. Die ungefähre Zellkonzentration pro Well betrug 5x10<sup>4</sup> bis 5x10<sup>6</sup> Zellen.

2 – 3 Wochen später wurden die entstandenen Zellkolonien (Hybride) entnommen und in neue Kulturplatten überführt.

### **c) Bestimmung der Antikörperspezifität**

Die Spezifität der in die Zellkultur abgegebenen Antikörper wurden in einem ersten Testschritt mit Hilfe von Immunisierungsantigen-beschichteten Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung  $1 \mu\text{g/ml} \approx 0,015 \mu\text{g/Vertiefung}$ , getestet.

In jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte wurden  $100 \mu\text{l}$  Zellkulturüberstand (Verdünnung 1:2) pipettiert und 1 Stunde bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Platte mit Waschlösung-POD (OSEW; Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) wurden in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  anti-Maus IgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD-Konjugat (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und 1 Stunde bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Platte wurde in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  Chromogen TMB-Lösung (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und weitere 30 Minuten bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  Stopplösung POD (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und die Mikrotitrationsplatte am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) bei  $450 \text{ nm}$  ausgewertet.

In einem 2. Testschritt wurden die Hybride wie oben beschrieben überprüft mit Hilfe von Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), die mit Humantransferrin (z.B. Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) beschichtet waren. Beschichtung  $1 \mu\text{g/ml} \approx 0,015 \mu\text{g/Vertiefung}$ .

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Bestimmung der Antikörperspezifität durch Auswertung der Mikrotitrationsplatten am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) bei 450 nm.

Hybridbezeichnung	Extinktion bei 450 nm	
	Nichtglycosyliertes Humantransferrin	Humantransferrin
98-22/026 (569)	> 2,5	Negativ
98-23/07 (45)	> 2,5	Negativ
98-22/0104 (572)	1,739	Negativ
98-84/011 (1)	> 2,5	Negativ
01-102/01 (113)	> 2,5	Negativ

Legende: negativ = Extinktion bei 450 nm < 0,1; bei Verdünnung der untersuchten Hybride keine Abstufung des Signals

#### d) Klonierung

Einzelne Zellen von Hybriden, die die erfindungsgemäßen Antikörper produzieren (Bindung an nichtglycosyliertes human Transferrin nicht jedoch an human Transferrin, wurden mit einem Mikromanipulator (Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland) kloniert. Die so erhaltene Klon 98-84/011 und 01-102/01 wurden am 16.04.2002 bei der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Deutschland, unter der Eingangsnummer DSM ACC2540 (98-84/011) und DSM ACC2541 (01-102/01) hinterlegt.

#### e) Bestimmung der Antikörpersubklasse

Die Subklasse der Antikörpers 98-84/011 und 01-102/01 wurde mittels IsoStrip™-Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit- der Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland als IgG<sub>1</sub> für 98-84/011 und 01-102/01 bestimmt.

#### f) Produktion der Antikörper

Für die Produktion größerer Mengen Antikörper werden die entsprechenden Zellklone in Rollerflaschen (Fa. Corning Costar Deutschland, Bodenheim) überführt, und bis zum gewünschten Endvolumen bei +37°C expandiert. Danach wird die Rollerkultur-Suspension zur Entfernung der Zellen über 0,22 µm filtriert. Die jetzt zellfreie Antikörperlösung wird über Ultrafilter (Trenngrenze 30 000 Dalton) ankonzentriert und anschließend aufgereinigt.

#### **g) Reinigung der Antikörper**

Die erhaltene Antikörperlösung wird gegen 0,14 M Phosphatpuffer pH 8,6 umgepuffert und auf ein mit rProtein A Sepharose Fast Flow (Fa. Amersham Pharmacia) gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen (pro 10 mg zu reinigender Antikörper werden 1 ml rProtein A Sepharose Fast Flow eingesetzt). Alle nicht gebundenen Komponenten werden durch Waschen der Säule mit 0,14 M Phosphatpuffer pH 8,6 entfernt. Der gebundene Antikörper wird mit 0,1 M Zitronensäure pH 3,0 von der Säule eluiert und gegen 0,05 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl + 0,05 M Tris + 0,01% Natriumazid pH 7,0 dialysiert.

#### **Beispiel 6: Bestimmung der Spezifität der Antikörper für festphasengebundene Antigene: Vergleich erfindungsgemäßer Antikörper mit Antikörpern gemäß dem Stand der Technik**

Die Spezifität der gewonnenen Antikörper wurden mit Hilfe von a) nichtglycosyliertem Transferrin beschichteten Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung 1 µg/ml  $\approx$  0,015 µg/Vertiefung, b) human Transferrin beschichteten Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung 1 µg/ml  $\approx$  0,015 µg/Vertiefung, c) Peptid P1 beschichteten Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung 3 µg/ml  $\approx$  0,045 µg/Vertiefung und d) Peptid P2 beschichteten Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung 3 µg/ml  $\approx$  0,045 µg/Vertiefung, getestet.

In jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte wurden 100 µl monoklonaler Antikörper (1 µg/ml) pipettiert und 1 Stunde bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Platte mit Waschlösung-POD (OSEW; Fa. Dade Behring, Marburg,

Deutschland) wurden in jede Vertiefung 100 µl anti-Maus IgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD-Konjugat (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und 1 Stunde bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Platte wurde in jede Vertiefung 100 µl Chromogen TMB-Lösung (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und weitere 30 Minuten bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jede Vertiefung 100 µl Stopplösung POD (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und die Mikrotitrationsplatte am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland ) bei 450 nm ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2:** Bestimmung der Antikörperspezifität durch Auswertung der Mikrotitrationsplatten am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) bei 450 nm.

		Extinktion bei 450 nm			
		Nicht-glycosyliertes human Transferrin	Human Transferrin	Peptid P1	Peptid P2
Antikörper					
<b>Erfindungsgemäße Antikörper</b>	98-22/026	1,578	Negativ	Negativ	Negativ
	98-23/07	2,497	Negativ	Negativ	Negativ
	98-22/0104	1,179	Negativ	Negativ	Negativ
	98-84/011	> 2,5	Negativ	Negativ	Negativ
	01-102/01	2,432	Negativ	Negativ	Negativ
Antikörper aus dem Stand der Technik gegen Peptid P1	00-177/012	1,063	0,157	> 2,5	Negativ
	01-32/062	> 2,5	0,151	> 2,5	Negativ
Antikörper aus dem Stand der Technik gegen Peptid P2	00-187/016	2,339	Negativ	Negativ	> 2,5
	00-187/027	> 2,5	Negativ	Negativ	> 2,5

Legende: negativ = Extinktion 450 nm < 0,1; bei Verdünnung des untersuchten Hybride keine Abstufung des Signals.

Die erfindungsgemäßen Antikörper zeigen nur eine Reaktion mit nichtglycosyliertem Transferrin, wobei die Antikörper aus dem Stand der Technik eine Reaktion mit dem jeweiligen Peptid und dem auf der Festphase gebundenen nichtglycosyliertem Transferrin zeigen.

**Beispiel 7: Bestimmung der Spezifität der Antikörper für Antigene in Lösung:  
Vergleich erfindungsgemäßer Antikörper mit Antikörpern gemäß  
dem Stand der Technik**

Mikrotitrationsplatten (Fa. Nunc, Typ B), werden mit den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern und mit monoklonalen Antikörpern aus dem Stand der Technik beschichtet. Beschichtungskonzentration  $1 \mu\text{g/ml} \approx 0,015 \mu\text{g/Vertiefung}$ .

In die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte wurden  $100 \mu\text{l}$  einer geometrischen Verdünnungsreihe beginnend bei  $200 \mu\text{g/ml}$  von a) human Transferrin, b) enzymatisch deglycosyliertes human Transferrin, c) human Transferrin aus Normalserum und d) human Transferrin aus Alkoholiker-Serum pipettiert und 1 Stunde bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Platte mit Waschlösung-POD (OSEW; Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) wurden in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  Anti-Human-Transferrin-POD-Konjugat (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und 1 Stunde bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Platte wurde in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  Chromogen TMB-Lösung (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und weitere 30 Minuten bei  $+15$  bis  $+25^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  Stopplösung POD (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und die Mikrotitrationsplatte am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland ) bei  $450 \text{ nm}$  ausgewertet.

**Tabelle 3.1:** Bestimmung der Reaktivität durch Auswertung der Mikrotitrationsplatten am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) bei 450 nm.

Extinktion bei 450 nm												
Antigen	Konz [µg/ml]	Erfindungsgemäße Antikörper				Antikörper gemäß dem Stand der Technik				Erfindungsgemäße Antikörper		
		98-23/07	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016	00-187/027	Antigen			01-102/01	01-32/062
Human Transferrin	200	1,790	2,5	0,137	Negativ	0,508	0,553	Nichtglycosyliertes humanes Transferrin			1,773	0,388
	100	0,664	2,5	Negativ	Negativ	0,230	0,291				1,582	0,262
	50	0,541	2,5	Negativ	Negativ	0,123	0,170				1,570	0,160
	25	0,491	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				1,601	0,104
	12,5	0,320	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				1,274	Negativ
	6,25	0,158	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				1,238	Negativ
	3,125	Negativ	1,880	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				1,230	Negativ
	1,56	Negativ	0,604	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				0,880	Negativ
	0,781	Negativ	0,407	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				0,890	Negativ
	0,391	Negativ	0,284	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				0,722	Negativ
	0,195	Negativ	0,169	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ				0,436	Negativ

negativ = Extinktion 450 nm < 0,1

**Tabelle 3.2:** Bestimmung der Reaktivität durch Auswertung der Mikrotitrationsplatten am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) bei 450 nm.

Extinktion bei 450 nm															
	Erfindungsgemäße Antikörper				Antikörper gemäß dem Stand der Technik				Erfindungsgemäße Antikörper			Antikörper gemäß dem Stand der Technik			
Antigen	Konz [µg/ml]	98-23/07	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016	00-187/027	Antigen	Konz [µg/ml]	98-23/07	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016	00-187/027
Human Transferrin aus Normalserum	200	0,309	2,5	0,188	Negativ	0,142	0,192	human Transferrin aus Alkoholiker-Serum	200	0,508	2,5	Negativ	Negativ	0,118	0,133
	100	0,229	2,5	0,116	Negativ	Negativ	0,158		100	0,660	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	50	0,177	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	0,111		50	0,306	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	25	0,141	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		25	0,252	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	12,5	0,100	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		12,5	0,181	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	6,25	Negativ	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		6,25	0,101	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	3,125	Negativ	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		3,125	Negativ	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	1,56	Negativ	1,234	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		1,56	Negativ	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	0,781	Negativ	0,745	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		0,781	Negativ	2,5	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	0,391	Negativ	0,450	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		0,391	Negativ	1,676	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
	0,195	Negativ	0,245	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ		0,195	Negativ	0,920	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

negativ = Extinktion 450 nm < 0,1

### **Beispiel 8: Epitop-Kartierung**

Scans überlappender Peptide, die aus der Sequenz des humanen Transferrins abgeleitet wurden (13-mere Peptide, 11 Aminosäuren überlappend), wurden mit Hilfe der SPOT-Synthese-Technologie hergestellt. Die Verfahren sind beschrieben in: Wenschuh, H. et al. (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides, *Biopolymers (Peptide Science)*, 55:188-206. Die Peptide wurden C-terminal an einen Celluloseträger gekoppelt und tragen am N-Terminus einen Reaktivitätstag. Nach Abspaltung der Peptide von ausgestanzten SPOTs (96-well Mikrotitrationsplatten) wurden sie auf aktivierte Glaschips gekoppelt. Das Inkubationsprotokoll für diese Glaschips lautet wie folgt:

#### Monoklonale Antikörper gemäß dem Stand der Technik

- Äquilibrierung in TBS-Puffer, pH 8.0
- 2 h Blockierungspuffer, pH 8.0
- 2 h Antikörperinkubation (3 µg/ml) in Blockierungspuffer, pH 8.0
- Waschen mit TBS (0.05% Tween20)
- 2 h Inkubation mit anti-Maus-IgG-POD in Blockierungspuffer, pH 8.0
- 3 x 5 min Waschen mit TBS (0.05% Tween20)
- Detektion mittels Chemolumineszenz (Lumilmager, Roche Diagnostics)

#### Erfindungsgemäßer Antikörper 98-84/011

- Äquilibrierung in TBS-Puffer, pH 8.0
- 2 h Blockierungspuffer, pH 8.0
- 2 h Antikörperinkubation (3 µg/ml) in Blockierungspuffer, pH 8.0
- 3 x 5 min Waschen mit TBS (0.05% Tween20)
- Detektion mittels Chemolumineszenz (Lumilmager, Roche Diagnostics)

Der erfindungsgemäße Antikörper wurde direkt mit Peroxidase markiert. Die Methode ist in der Literatur beschrieben: Wilson, M. B. and Nakane, P. K. (1978) Recent developments in the periodate method of conjugating harseradish

peroxidase (HRPO) to antibodies, In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques (Eds.: Knapp, W.; Holubar, K.; Wick, G.) pp. 215-224.

Nach Auswertung der Untersuchung ergeben sich für die Antikörper gemäß dem Stand der Technik die folgenden bindenden Peptide:

Antikörper gemäß dem Stand der Technik gegen Peptid 1

1. VLAENYNKSDNCE
2. AENYNKSDNCEDT
3. NYNKSDNCEDTPE
4. NKSDNCEDTPEAG

Antikörper aus dem Stand der Technik gegen Peptid 2

1. VHKILRQQQHFLFG
2. KILRQQQHFLFGSN
3. LRQQQHFLFGSNVT
4. QQQHFLFGSNVTDC
5. QHLFGSNVTDCSG

Die erkannten Sequenzen sind identisch mit den zur Immunisierung eingesetzten Peptiden.

Der erfindungsgemäße Antikörper 98-84/011 reagiert mit vier dominanten Sequenzabschnitten:

1. VVARSMGGKEDLI
2. ARSMGGKEDLIWE
3. SMGGKEDLIWELL
4. TTEDSIAKIMNGE
5. SIAKIMNGEADAM
6. AKIMNGEADAMSL
7. IMNGEADAMSLDG
8. NGEADAMSLDGGF
9. SKLSMGSGNLNLSE
10. LSMGSGNLNLSEPN
11. YEKYLGE EYVKAV

Der Bereich 1. – 3. befindet sich in der N-terminalen Domäne des Transferrins , während die Bereiche 4. – 8., 9. – 10. und 11. in der C-terminalen Domäne liegen und ein diskontinuierliches Epitop darstellen.

**Patentansprüche:**

1. Antikörper, der in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht, wobei dem Transferrin-Homologen mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen.
2. Antikörper nach Anspruch 1, der an die gemäß EP-0 605 627 hergestellten Peptide P1 oder P2 nicht oder im wesentlichen nicht bindet.
3. Antikörper nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sein Bindungsverhalten entweder gegenüber festphasengebundenen oder in wäßriger Lösung befindlichen Peptiden P1 oder P2 festgestellt wurde.
4. Antikörper, der selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung im Bereich der folgenden Sequenzabschnitte (1) bis (4) des Transferrin-Homologen erfolgt:

(1)	VVARSMGGKEDLIWELL	und
(2)	TTEDSIKIMNGEADAMSLDGGF	und
(3)	SKLSMGSGGLNLSEPN	und
(4)	YEKYLGEELYVKAV.	
5. Antikörper nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung lediglich im Bereich dreier der Sequenzabschnitte (1) bis (4) erfolgt.
6. Antikörper nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung lediglich im Bereich zweier der Sequenzabschnitte (1) bis (4) erfolgt.

7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß er ein monoklonaler Antikörper ist.
8. Monoklonaler Antikörper, der von der Zellkultur mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2540 produziert wird.
9. Monoklonaler Antikörper, der von der Zellkultur mit der mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2541 produziert wird.
10. Antigenbindendes Fragment, herstellbar aus einem Antikörper gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 9.
11. Verfahren zur Herstellung des Antikörpers gemäß Anspruch 1 durch Immunisieren eines geeigneten Versuchstieres mit nichtglycosyliertem Transferrin, Fusionieren der Milzzellen dieses Versuchstieres mit Myelomzellen, wobei antikörperproduzierende Hybridzellen entstehen, Klonieren der Hybridzellen und Selektieren eines solchen Hybridzellklons, der einen Antikörper produziert, der in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes bindet, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht, wobei dem Transferrin-Homologen mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen und Gewinnen von Antikörpern aus dem solchermaßen selektierten Hybridzellklon nach einem dem Fachmann bekannten Verfahren.
12. Verfahren zur Herstellung des Antikörpers gemäß Anspruch 4 durch Immunisieren eines geeigneten Versuchstieres mit nichtglycosyliertem Transferrin, Fusionieren der Milzzellen dieses Versuchstieres mit Myelomzellen, wobei antikörperproduzierende Hybridzellen entstehen, Klonieren der Hybridzellen und Selektieren eines solchen Hybridzellklons, der einen Antikörper produziert, dessen Bindung nach den Ergebnissen einer Epitop-Kartierung im Bereich der folgenden Sequenzabschnitte (1) bis (4) eines Transferrin-Homologen, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, erfolgt:  
(1) VVARSMGGKEDLIWELL und

- (2) TTEDSIKIMNGEADAMSLDGGF und
- (3) SKLSMSGSLNLSEPN und
- (4) YEKYLGEELYVKAV;

und Gewinnen von Antikörpern aus dem solchermaßen selektierten Hybridzellklon nach einem dem Fachmann bekannten Verfahren.

- 13. Immunoassay zum Nachweis eines Transferrin-Homologen, dem mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 oder das antigenbindende Fragment gemäß Anspruch 10 mit der Probe in Kontakt gebracht und die Bildung eines Immunkomplexes unter Beteiligung des Transferrin-Homologen qualitativ oder quantitativ bestimmt wird.
- 14. Testkit zur Durchführung eines Immunoassays gemäß Anspruch 13 enthaltend einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 oder das antigenbindende Fragment gemäß Anspruch 10.

Dade Behring Marburg GmbH

2002/B001 – Ma 1248

Dr. Buck / Mi

### **ZUSAMMENFASSUNG**

#### **Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) –spezifische Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper, die in wäßriger Lösung selektiv an ein Transferrin-Homologes (CDT) binden, ohne daß dieses an eine feste Phase gebunden zu sein braucht. CDT ist dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der zwei Oligosaccharidketten, die normalerweise an Asn 413 und/oder Asn 611 des Transferrins gebunden sind, ganz oder im wesentlichen ganz fehlen.